

10/031,14y

PCT/EP 00/07253

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 29 SEP 2000

WIPO

PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

EP 00/07253

**Aktenzeichen:** 100 14 085.8

**Anmeldetag:** 22. März 2000

**Anmelder/Inhaber:** BASF Aktiengesellschaft,  
Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und deren  
Verwendung zur Oxidation von organischen Ver-  
bindungen

**IPC:** C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident  
Im Auftrag

Hoß

## Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und deren Verwendung zur Oxidation von organischen Verbindungen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche zur Oxidation verschiedener organischer Substrate, wie z.B. N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen, befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

Enzyme mit neuartigen Funktionen und Eigenschaften können entweder durch Screening natürlicher Proben oder durch Protein Engineering bekannter Enzyme bereitgestellt werden. Die letztgenannte Methode kann unter Umständen die geeignetere sein, um Eigenschaften zu induzieren, deren Generierung auf dem Wege natürlicher Selektion unwahrscheinlich ist. Trotz zahlreicher Anstrengungen zum Engineering von Enzymen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Studien zur Förderung der katalytischen Aktivität von Enzymmutanten bezüglich eines bestimmten Substrates (1-10). In diesen bekannten Fällen sind die Substrate strukturell eng verwandt mit dem nativen Substrat des jeweiligen Enzyms. Bisher gibt es keine Berichte über ein erfolgreiches Engineering von Enzymen, welche nach der Modifikation die Umsetzung einer Verbindung katalysieren, welche strukturell völlig verschieden vom nativen Substrat des Enzyms ist.

Die aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (11-13). Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12

werden nicht hydroxyliert (11).

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgen-  
strukturanalyse bestimmt (14-16). Die Substratbindungsstelle  
5 liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche  
von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und  
wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten be-  
grenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der  
Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß  
10 diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch  
Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind (14).  
Die Mutation von Arg47 zu Glu bewirkt eine Inaktivierung des  
Enzyms für Arachidonsäure (13), erhöht jedoch dessen Aktivität  
gegenüber C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-Alkyltrimethylammonium-Verbindungen (17). Eine  
15 Substratnutzung für aromatische Verbindungen, insbesondere  
ein-, zwei- oder mehrkernige, gegebenenfalls heterocyclische,  
Aromaten, Alkane, Alkene, Cycloalkane und -alkene, wurde für  
dieses Enzym nicht beschrieben. Es wurde deshalb bisher in der  
Fachwelt angenommen, daß andere als die bisher beschriebenen  
20 organischen Substrate, wie z.B. Indol, aufgrund der deutlichen  
strukturellen Unterschiede zu den nativen Substraten von P450  
BM-3, insbesondere aufgrund des Fehlens funktioneller Gruppen,  
welche an die oben erwähnten Reste in der Substrattasche bin-  
den könnten, keine Substrat darstellen.

25 Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Cyto-  
chrom P450 Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität  
oder verändertem Substratprofil bereit zu stellen. Insbesonde-  
re sollten Monooxygenase-Mutanten bereitgestellt werden, welche  
30 im Vergleich zu dem nichtmutierten Enzym mit strukturell deut-  
lich anderen Substraten enzymatisch aktiv sind.

Diese Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch  
neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche z.B. zur Oxi-  
35 dation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer  
Verbindungen befähigt sind.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Monooxygena-

sen, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme neuer, wie z.B. N-heterocyclischer Substrate, befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die neuen Monooxygenase löslich, d.h. in nicht-membrangebundener Form existent, und in dieser Form enzymatisch aktiv.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs, wie insbesondere abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionelle, d.h. die Oxidation neuer organischer Substrate, wie z.B. N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, fördernde Mutation, in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224 (F/Galopp-Bereich), 39-43 ( $\beta$ -strand 1), 48-52 ( $\beta$ -strand 2), 67-70 ( $\beta$ -strand 3), 330-335 ( $\beta$ -strand 5), 352-356 ( $\beta$ -strand 8), 73-82 (helix 5) und 86-88 (helix 6) aufweist.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten Cytochrom-P450 Monooxygenase-Mutanten, sind bevorzugt zu wenigstens einer der folgenden Reaktionen befähigt:

- a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen;
- b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehrkerniger Aromaten;
- c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Alkene; und
- d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und Cycloalkene

Besonders bevorzugten Monooxygenase-Mutanten dieses Typs sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- 1) Phe87Val;
- 2) Phe87Val, Leu188Gln; oder

3) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;  
sowie funktionale Äquivalente davon. Der Zahlenwert gibt dabei  
die Position der Mutation an; vor dem Zahlenwert steht die  
ursprüngliche, hinter dem Zahlenwert die neu eingeführte Ami-  
nosäure.

Funktionale Äquivalente oder Analoga der konkret offenbarten  
Mutanten sind in diesem Zusammenhang davon verschiedene Mutan-  
ten, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im  
Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreak-  
tionen a) bis d), also beispielsweise gegenüber heterozykli-  
schen Aromaten, besitzen und z.B. Indol hydroxylieren.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß  
auch Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten  
Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Amino-  
säuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante  
führen, die ebenso wie die konkret genannte Mutante ein gegen-  
über dem Wildtypenzym "verändertes Substratprofil" zeigen und  
wenigstens eine der oben genannten Oxidationsreaktionen kataly-  
sieren. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann  
gegeben, wenn die Veränderungen im Reaktivitätsmuster qualita-  
tiv übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit  
unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-  
Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die kon-  
kret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzy-  
men aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise  
lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenz-  
regionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular  
Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben  
der Erfindung äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende  
Mutationen vorgenommen werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder  
mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -  
Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei

die genannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit "verändertem Substratprofil" im obigen Sinne führen.

5 Erfindungsgemäß ~~oxidierbare Substrate der Gruppe a)~~ sind gegebenenfalls ~~substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;~~ insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-heterocyclische ein-,  
10 vorzugsweise zwei oder drei, insbesondere zwei, vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder  
15 S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere, gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für  
20 geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t-Butyl oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen;  
25 Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei  
30 Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z.B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z.B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.  
35 Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromaten wie Acridin und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl, oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis sieben-gliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C-C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroatome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt werden n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z.B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben genannten Alkane.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene. Beispiele hierfür sind Cyclopentan, Cyclopenten, Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei

ein- oder mehrfach, wie z.B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nichtlimitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionon, sowie die entsprechenden Methy lionone und Iso-methy lionone. ~~Besonders bevorzugt sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon.~~

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine der obigen Monooxygenasen. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1, welche wenigstens eine Nukleotidsubstitution aufweist, die zu einer der oben beschriebenen funktionellen Aminosäuremutationen führt. Gegenstand der Erfindung sich außerdem durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide erhaltenen funktionalen Analoga der Nukleinsäuren, welche weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Substratspezifität, insbesondere mit Indol-oxidierender Aktivität, kodieren.

Erfindungsgemäß umfassen auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten davon.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und



gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der  $P_{rP_1}$ -Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40,

CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

5.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley-Interscience, New York 1997, beschrieben.

20 Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder  
30 CHO-Zellen.

35

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen gemäß obiger Definition, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a1) ~~einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium in Gegenwart eines exogenen~~ (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten Substrats, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, kultiviert; oder
- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem erfindungsgemäßen Enzym, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

Bevorzugt ist das ~~exogene oder intermediär gebildete~~ Substrat ausgewählt unter

- a) ~~gegebenenfalls substituierten N-heterocyclischen~~ ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) ~~gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen~~ Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.

Eine bevorzugte Verfahrensvariante ist auf die Bildung von Indol/Indirubin gerichtet und dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat ~~intermediär gebildetes Indol ist und man aus dem Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildetem Indol erzeugt wurde.~~

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer

Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von Indol ist gewöhnlich nicht erforderlich, da dieses vom Mikroorganismus intermediär gebildet wird. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promotors. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z.B. 42 °C beim P<sub>1</sub>P<sub>1</sub>-Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monooxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der Temperatur wieder einen Wert von etwa 30 bis 40 °C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt. Der pH-Wert kann dabei durch Zugabe von NaOH, z.B. auf 9 bis 10, erhöht werden, wodurch die Indigobildung bzw. Indirubinbildung durch Luftoxidation der enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte 2- und 3-Hydroxyindol zusätzlich gefördert wird.

Wird die erfindungsgemäße Umsetzung (Mono- und/oder Di-Hydroxylierung) dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem exogenes Substrat enthaltenden, wie z.B. Indol enthaltenden, Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50 °C, wie z.B. 30 bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

- 5 Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Bioreaktoren, umfassend ein erfindungsgemäßes Enzym oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in immobilisierter Form.

- 10 Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase oder eines erfindungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur mikrobiologischen Oxidation eines Substrates aus einer der Gruppen a) bis d), insbesondere N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, und bevorzugt zur Bildung von  
15 Indigo und/oder Indirubin.

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

20 Beispiel 1:

Randomisierung spezieller Codons von P450 BM-3

- 25 Die Versuche wurden im wesentlichen wie beschrieben in (19) durchgeführt. Drei Positionen (Phe87, Leu188 und Ala74) wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange kit (La Jolla, CA, USA) randomisiert. Folgende PCR-Primer wurden für die einzelnen Positionen verwendet: Phe87: 5'-gcaggagacgggttgnnnacaagctggacg-3' (SEQ ID  
30 NO:3), 5'-cgtccagcttgtnnneaaccgtctcctgc-3', (SEQ ID NO:4)  
Leu188: 5'-gaagcaatgaacaagnnncagcgagcaaatccag-3' (SEQ ID NO:5), 5'-actggatttgctcgctgtnnncttggtteattgcttc-3' (SEQ ID NO:6;  
Ala74: 5'-gctttgataaaaacttaaaagteaannncttaaatgttacg-3' (SEQ ID  
35 No:7, 5'-cgtacaaatttaagnnnttgacttaagtttttatcaaagc-3' (SEQ ID NO:8)

Die Bedingungen für die PCR waren für alle drei Positionen identisch. Insbesondere wurden je 50 µl Reaktionsvolumen 17,5

pmol eines jeden Primers, 20 pmol Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu Polymerase und 3,25 nmol von jedem dNTP verwendet. Die PCR Reaktion wurde bei 94°C /1 min gestartet und dann wurde folgender Temperaturzyklus 20 mal durchgeführt: 94°C, 1 min; 46°C, 2,5 min; 72°C, 17 min. Nach 20 Zyklen wurde die Reaktion 15 min bei 72°C fortgesetzt. Nach der PCR wurde die Template DNA mit 20 U DpnI bei 37°C 3 h verdaut. Anschließend wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 150  $\mu$ g/ml Ampicillin enthielten. Anschließend wurde 18 h bei 37°C inkubiert.

#### Beispiel 2:

#### Expression und Reinigung der P450 BM-3 und dessen Mutanten und Produktion eines blauen Pigmentes

Das P450 BM-3-Gen und die Mutanten davon wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren  $P_{RPL}$ -Promotors des Plasmids pCYTEXP1 in *E. coli* DH5 $\alpha$  wie bereits beschrieben (20), exprimiert. Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, enthaltend je Vertiefung 200  $\mu$ l TB-Medium und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin transferiert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 40  $\mu$ l der Zellkultur einer jeden Vertiefung wurden anschließend in ein Kulturröhrchen überführt, das 2 ml TB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthält. Anschließend wurde 2 h bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Tempertur zur Induktion 6 h auf 42°C erhöht. Dann wurde die Kultivierung über Nacht bei 37°C fortgesetzt, wobei ein blaues Pigment produziert wurde.

Die präparative Herstellung von Enzym oder blauem Pigment wurde ausgehend von einer 300 ml Zellkultur ( $OD_{578nm}$  = 0,8 bis 1,0) durchgeführt. Zur Isolierung des Enzymes wurden die Zellen 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 0,1 M  $K_xPO_4$ -Puffer, pH 7,4 resuspendiert. Die eisgekühlten Zellen wurden mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) bei einer Energieoutput von 80 W durch dreimalige Beschallung von 2 min

vorsichtig aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden 20 min bei 32570 x g zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung bzw. zur Enzymreinigung eingesetzt. Die Enzymreinigung erfolgte wie in (21) bereits beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Extinktionsdifferenz bei 450 und 490 nm, wie in (11) bereits beschrieben, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

### Beispiel 3:

#### Isolierung von Mutanten, welche große Mengen an blauem Pigment produzieren

Jeweils 100 Kolonien wurden von den Mutanten einer jeden Position isoliert, welche durch randomisierte Mutagenese des Codons der entsprechenden Position erzeugt wurden. Diese Kolonien wurden in Kulturröhrchen zur Produktion von blauem Pigment kultiviert. Nachdem Waschen der Zellen mit Wasser und mehreren langsamen Zentrifugationsschritten ( $500 \text{ g}$ ) wurde das blaue Pigment mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Die Löslichkeit des blauen Pigmentes war in DMSO am größten. Die Absorption des Extraktes wurde bei 677 nm bestimmt. Diejenige Mutante, welche die größte Menge an blauem Pigment von allen Mutanten einer bestimmten Position produzierte, wurde für eine DNA-Sequenzierung (ABI DNA Sequenzierungs-Kit; ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) verwendet und außerdem als Template für ortsspezifische randomisierte Mutagenese verwendet.

### Beispiel 4:

#### Aktivitätstest für die Indol-Hydroxylierung

Die Indol-Hydroxylierungsaktivität wurde in einer Lösung getestet, die 8  $\mu\text{l}$  einer 10-500 mM Indollösung in DMSO, 850  $\mu\text{l}$  Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,6 nmol P450 BM-3 Wildtyp oder Mutante in einem Endvolumen von 1 ml enthielt. Das Gemisch wurde 9 min vorinkubiert, bevor man die Reaktion durch



Zugabe von 50  $\mu$ l einer wässrigen 1 mM Lösung von NADPH startete. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch Zugabe von 60  $\mu$ l 1,2 M KOH gestoppt. Innerhalb von 5 bis 30 sec (unter aeroben Bedingungen) wurden die Enzymprodukte vollständig in Indigo [ $\Delta^{2,2'}$ -Biindolin]-3,3'-dion) und Indirubin ([ $\Delta^{2,3'}$ -Biindolin]-2',3-dion) überführt. Die Indigoproduktion wurde über dessen Absorption bei 670 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit reinem Indigo zeigte einen Extinktionskoeffizienten von  $3,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei dieser Wellenlänge. Ein linearer Kurvenverlauf wurde für die Indigoproduktion in einer Reaktionszeit von 40 sec unter Verwendung von 0,6 nmol Wildtyp bzw. P450 BM-3-Mutante und 0,05 bis 5,0 mM Indol erhalten. Indirubin zeigt eine sehr schwache Absorption bei 670 nm und die gebildete Indirubinmenge war sehr viel geringer als die gebildete Indigomenge. Die Bildung von Indirubin wurde bei der Bestimmung der kinetischen Parameter vernachlässigt. Der NADPH-Verbrauch wurde bei 340 nm bestimmt und unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von  $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wie beschrieben (17) berechnet.

#### 20 Beispiel 5:

##### Reinigung von Indigo und Indirubin

25 Nach Waschen der Zellen mit Wasser und wiederholter Zentrifugation bei 500 g wurde das gebildete blaue Pellet mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene eingedampft und das rote Pigment wurde mehrmals mit 50 ml absolutem Ethanol extrahiert. Der verbleibende blaue Feststoff wurde in THF gelöst und durch Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Die Ethanollösung wurde eingedampft und durch Silicagelchromatographie (DC 60, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 cm x 30 cm) gereinigt, bevor sie mit THF und Petrolether in einem Verhältnis von 1:2 gewaschen wurde. Die erhaltene rote Lösung wurde eingedampft und deren Reinheit wurde durch TLC bestimmt. Die Absorptionsspektren des blauen und des roten Pigmentes wurden mit Hilfe eines Ultraspec 3000 Spektrophotometers (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in einem Bereich von 400 bis 800 nm bestimmt. Außerdem wurde der blaue

und der rote Farbstoff durch Massenspektrometrie und  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie analysiert.

### Versuchsergebnisse

#### 1. Erhöhung der Produktivität für blaues Pigment durch P450 BM-3-Mutagenese

Natives P450 BM-3 besitzt nicht die Fähigkeit zur Produktion des blauen Indigo-enthaltenden Pigments, bzw. der Vorläufersubstanten 2- bzw 3-Hydroxyindol. Um eine ausreichende Menge an blauem Pigment herstellen zu können, wurde P450 BM3 einer gezielten Evolution ausgesetzt. Sämtliche Mutanten, welche das blaue Pigment produzierten, wurden sequenziert. Es wurde festgestellt, daß wenigstens eine der folgenden drei Positionen mutiert waren: Phe87, Leu188 und Ala74. Es wurde deshalb angenommen, daß diese drei Positionen eine entscheidende Rolle für die Aktivität von P450 BM-3 bei der Produktion von blauem Pigment spielen. Aus der Struktur der Häm-Domäne von Cytochrom P450 BM-3, komplexiert mit Palmitoleinsäure sieht man, daß Phe87 das Substrat an einem näheren Heranrücken an die Häm-Gruppe hindert (14). Die Mutante Phe87Val zeigt eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Epoxidation von (14S, 15R)-Arachidonsäure (13) und die Mutante Phe87Ala verschiebt die Hydroxylierungsposition von  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 und  $\omega$ -3 zu  $\omega$  (22). Die Position 87 wurde deshalb als erste für die ortsspezifische randomisierte Mutagenese mit Hilfe von PCR ausgewählt. In Röhchenkulturen wurden 7 Kolonien erhalten, welche eine geringe Menge an blauem Pigment nach Induktion produzierten. Die Kolonie, welche die größte Menge des blauen Pigments produzierte, wurde für die DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten ergaben eine Substitution von Phe87 durch Val. Die Mutante Phe87Val wurde anschließend als Template für die zweite Runde der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese an Position Leu188 verwendet. Die Struktur der Häm-Domäne, komplexiert mit Palmitoleinsäure zeigt, daß die Repositionierung der F- und G-Helices den Rest Leu188 in direkten Kontakt mit dem Substrat bringt (14). Diese Position könnte deshalb eine wichtige Rolle

bei der Substratbindung oder -orientierung spielen. Nach dem zweiten Screeningdurchgang wurden 31 Kolonien beobachtet, welche das blaue Pigment produzierten. Die Mutante, welche die größte Pigmentmenge produzierte, enthielt die Substitutionen Phe87Val und Leu188Gln. Diese Mutante wurde anschließend in Position Ala74 im dritten Durchgang der ortspezifischen randomisierten Mutagenese mutiert. Man erhielt dabei die Dreifachmutante F87L188A74 (Phe87Val, Leu188Gln und Ala74Gly), welche mehrere mg blaues Pigment in einem 2-Liter-Kolben, enthaltend 300 ml TB-Medium, produzierte. Diese Menge reichte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Pigmentes aus.

## 2. Isolierung und Identifizierung des blauen Pigments

Nach dem Auswaschen der Zellen wurde das verbleibende blaue Pellet mit THF extrahiert und TLC analysiert. Das blaue Pigment wurde in eine schneller wandernde blaue Komponente und in eine langsamer wandernde rote Komponente aufgetrennt. Beide Komponenten zeigten exakt die gleichen Mobilitätsparameter wie die Komponenten einer kommerziellen Indigo-Probe.

Nach der Reinigung wurden die Absorptionsspektren beider Komponenten in DMSO bestimmt. Die blaue Komponente zeigte das gleiche Spektrum wie eine kommerzielle Indigoprobe. Die gereinigte blaue und rote Komponente wurden jeweils durch Massenspektrometrie analysiert. Die Massenspektren beider Pigmente zeigten einen starken Moleküllonenpeak bei  $m/z = 262$  und zwei Fragmentenpeaks bei  $m/z = 234$  und  $205$  (relative Intensität jeweils 10%). Dieses Muster ist typisch für indigoide Verbindungen.

Die Elementarzusammensetzung dieser Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt als  $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ,  $C_{15}H_{10}N_2O$  bzw.  $C_{14}H_9N_2$ . Dies ist ebenfalls charakteristisch für Strukturen vom Indigotyp. Das blaue Pigment wurde somit als Indigo und das rote Pigment als Indirubin bestimmt. Zur Bestätigung der Struktur wurden 500 MHz  $^1H$ -NMR-Spektren beider Pigmente in DMSO- $D_6$ -Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben (23) überein.

### 3. Produktion von Indigo mit isolierten Enzymen

Es ist bekannt, daß Indigo aus Indol durch mikrobielle Transformation zugänglich ist (24,26). Keines dieser mikrobiellen Systemen enthält jedoch eine P450-Monooxygenase. Erfindungsgemäß wurde zunächst die katalytische Aktivität des reinen Enzyms für Indol bestimmt. Die Mutante F87L188A74 wurde mit Indol vermischt. Keine Farbreaktion war zu beobachten. Erst nach Zugabe von NADPH zum Reaktionsgemisch bildete sich das blaue Pigment nach etwa 20 min. Durch Einstellung des pH-Werts der Reaktionsmischung auf einen Wert von etwa 11, 30 sec nach Zugabe von NADPH, wurde die blaue Färbung innerhalb von wenigen Sekunden sichtbar. Kontrollversuche unter Verwendung von nativem P450 BM-3 waren immer negativ, selbst unter Verwendung erhöhter Konzentrationen an Enzym, Indol und NADPH. Das blaue Pigment wurde mit Ethylacetat extrahiert und durch TLC analysiert. Das blaue Pigment trennte sich wieder in eine schneller laufende blaue Komponente und in eine langsamer laufende rote Komponente auf. Die R<sub>f</sub>-Werte und die Absorptionsspektren waren identisch mit denjenigen Werten der Extrakte aus der Fermentationsbrühe. Die F87L188A74-Mutante von P450 BM-3 stellt somit eine Indolhydroxylase dar.

Es sind bisher zwei Wege für die enzymatische Transformation von Indol zu Indigo beschrieben worden. Ein Weg wird durch eine Dioxygenase, der andere durch eine Styrolmonooxygenase katalysiert (24,25). Die NADPH-Stöchiometrie beträgt in beiden Fällen 2. Es wurde deshalb angenommen, daß im Gegensatz zu den Dioxygenasen die erfindungsgemäße Mutante F87L188A74 Indol in nur einer Position hydroxyliert, um Oxindol (2-Hydroxyindol) oder Indoxyl (3-Hydroxyindol) zu bilden.

### 4. Kinetische Parameter der Indolhydroxylierung

Reine Proben des Wildtyp-Enzyms P450 BM-3 und der Mutanten Leu188Gln, Phe87Val, F87L188 und F87L188A74 wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Indolhydroxylierung verwendet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammenge-

faßt.

Tabelle 1 Kinetische Parameter der P450 BM-3 Mutanten für Indolhydroxylierung

Mutanten	$K_{cat}$ ( $S^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
WT	- <sup>a)</sup>	-	-
Leu188Gln	n.d. <sup>b)</sup>	n.d.	n.d.
Phe87Val	2,03 (0,14)	17,0 (1,0)	119
F87L188	2,28 (0,16)	4,2 (0,4)	543
F87L188A74	2,73 (0,16)	2,0 (0,2)	1365

<sup>a)</sup> keine Aktivität wurde beobachtet;

<sup>b)</sup> nicht bestimmt (Aktivität war zu gering um gemessen zu werden)

Selbst beim Überschuß an gereinigtem Enzym und hoher Indolkonzentration ist das Wildtyp-Enzym nicht in der Lage, Indol zu oxidieren. Die Mutante Leu188Gln zeigt eine geringe Aktivität. Die Mutante Phe87Val zeigt eine katalytische Wirksamkeit von  $119 M^{-1}s^{-1}$  für die Indolhydroxylierung. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante F87L188 (Phe87Val, Leu188Gln) erhöhte sich auf  $543 M^{-1}s^{-1}$  und wurde durch Einführung der weiteren Substitution Ala74Gly auf  $1365 M^{-1}s^{-1}$  erhöht. Die  $K_{cat}$ -Werte erhöhten sich von Phe87Val zur Dreifachmutante hin um insgesamt 35%, während die  $K_m$ -Werte etwa um das Siebenfache abnahmen. Dies weist darauf hin, daß Ala74Gly und Leu188Gln vorwiegend an der Substatbindung beteiligt sind.

Die Indol-Turnover-Rate ( $K_{cat}=2,73 s^{-1}$ ) war für die Dreifachmutante F87L188A74 mehr als zehnfach höher als für die meisten P450-Enzyme (18).

Beispiel 6:n-Oktanhydroxylierung mit modifizierter Cytochrom P450 Mono-oxygenase

5.

Die Umsetzungen wurden mit einer P450<sub>BM-3</sub> Monooxygenase Mutante durchgeführt, die folgende Mutationen enthält: Phe87Val Leu188Gln Ala74Gly

10

Als Substrat wurde n-Octan gewählt. Für die Hydroxylierung des n-Octans wurde folgender aerober Reaktionsansatz verwendet:

P450 BM-3 Mutante: 17,5 mg

Reaktionspuffer: 9,1 ml (Kaliumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7.5)

15

Substrat: 50  $\mu$ l einer 60 mM Lösung (in Aceton)

Temperatur: 25°C

20

Enzymlyophilisat wurde in 500  $\mu$ l Reaktionspuffer gelöst und zunächst mit Substrat und Reaktionspuffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300  $\mu$ l

NADPH-Lösung (5 mg/ml). Die NADPH-Zugabe wurde noch zweimal wiederholt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 nm verfolgt, wobei die NADPH Abnahme beobachtet werden kann. NADPH wird dabei in 300  $\mu$ l-Schritten zugegeben,

25

da eine zu hohe Konzentration an NADPH in der Reaktionslösung zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Zur Isolierung der Produkte wurde anschließend die Reaktionslösung 3 mal mit 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und eingeengt. Anschließend wurden die Produkte über DC, GC/MS und NMR charakterisiert.

30

Die GC/MS-Analyse des Reaktionsgemisches führte zu folgendem Ergebnis:

Verbindung	Rt [min] <sup>1)</sup>	Umsatz [%]
4-Octanol	13.51	37
3-Octanol	14.08	47
2-Octanol	14.26	16

<sup>1)</sup>Temperaturprogramm: 40°C 1min isotherm / 3°C/min 95°C /10°C/min 275°C; Apparatur: Finnigan MAT 95; GC: HP 5890 Series II Split Injector; Säule: HP-5MS (Methylsiloxan) 30m x 0.25mm; Trägergas: 0,065 ml/min He

Edukt wurde nicht mehr gefunden.

#### Beispiel 7:

#### Hydroxylierung von Aromaten, Heteroaromaten und Trimethylcyclohexenylverbindungen

- a) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat Naphthalin eingesetzt wurde. Als Produkte wurden 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert. Vom eingesetzten Naphthalin wurden 88% umgesetzt.

#### Analytik für Umsetzungen mit Naphthalin

##### GC:

Apparatur: Carlo Erba Strumentazion Typ HRGC 4160 on Column Injector; Säule: DB5 30m x 0,2 mm; Material: 5%

Diphenyl- 95% Dimethylpolysiloxan; Trägergas: 0,5 bar H<sub>2</sub>; Temperaturprogramm: 40°C 1 min isotherm / 10°C/min bis 300°C

Rt (1-Naphthol) = 16.68

##### NMR:

Im <sup>1</sup>H-NMR konnte 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert werden.

b) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Oktan als Substrat 8-Methylchinolin eingesetzt wurde. Als Hauptprodukt wurde 5-Hydroxy-8-methylchinolin neben weiteren Derivaten (Produktverhältnis 5:1) identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 35% umgesetzt.

c) ~~Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-~~  
Oktan als Substrat  $\alpha$ -Ionon eingesetzt wurde. Als Haupt-  
produkt wurde 3-Hydroxy- $\alpha$ -ionon neben weiteren Derivaten  
(Produktverhältnis 76:24) identifiziert. Vom eingesetzten  
Edukt wurden 60% umgesetzt.

d) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-  
Oktan als Substrat Cumol (i-Propylbenzol) eingesetzt wur-  
de. Es wurden fünf Monohydroxyprodukte und ein Dihydrox-  
yprodukt identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 70%  
umgesetzt.



LITERATUR

1. Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95,5511-5515.
2. Zhang, J.-H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. C. (1997) Proc. Natl. Acad Sci. USA 94, 4504-4509.
3. Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G., and Smith, M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci USA 95,12825-12831.
4. Cronin, C. N. (1998) J. Biol. Chem 273,24465-24469.
5. Wilks, H. M., Hart, K- W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R., Holbrook, I J. (1988) Science 242, 1541-1544.
6. Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W. J. (1992) Science, 255, 1249-1253.
7. Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R., and Hurley, I B. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95, 5993-5997.
8. Quemeneur, E., Moutiez, J.-B. C., and Menez, A. (1998) Nature (London) 391, 301-303.
9. Marsden, A- F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, I Leadlay, P. F. (1998) Science 279, 199-201.
10. Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. US4 95, 11666-11670.
11. Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1990) J Biol. Chem 265, 4233-4239.
12. Capdevila, J. H., Wie, S., Helvig, C., Falck, J. R., Be-

losludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S. E., and Peterson, J. A. (1996) J. Biol. Chem 271, 22663-22671.

13. Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Flack, J. R., Wells, S., Helvig, C., Capdevilla, J. H. (1997) J. Biol. Chem 272, 1127-1135.

14. Li, H., Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol., 4, 140-146.

15. Ravichandran, K G., Sekhar, S., Boddupalli, S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, J (1993) Science 261, 731-736.

16. Modi S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.- Y., Roberts, G. C. K (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417.

17. Oliver, C.F., Modi S., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K. (1997) Biochem. J. 327, 537-544.

18. Guengerich, F.G. (1991) J. Biol. Chem 266, 10019-10022.

19. Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) Nature Biotechnology 17, 379-384.

20. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. (1999) Anal Biochem. 269, 359-366.

21. Schwaneberg, U., Sprauer, A., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. J of Chromatogr. A, in press.

22. Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K (1997) Biochemistry 36, 1567-1572.

23. Hart, S., Koch, K.R., and Woods, D.R. (1992) J Gen. Microbiol. 138, 211-216

24. Murdock, D., Ensley, B.D., Serdar, C. and Thalen, M.  
(1993) Bio/Technology 11, 381-385.
25. O'Connor, ICE., Dobson, A-W. and Hartmans, S. (1997)  
5. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4287-4291.
26. Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1995) J Bacteriol. 177,  
6983-6988.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> Neue Cytochrom P450 Monooxygenasen und deren Verwendung  
zur Oxidation von organischen Verbindungen

&lt;130&gt; M/41148

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus megaterium

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)..(3150)

&lt;400&gt; 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa 48  
 Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys  
 1 5 10 15

aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa 96  
 Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys  
 20 25 30

att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt 144  
 Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg  
 35 40 45

gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat 192  
 Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp  
 50 55 60

gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt 240  
 Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg  
 65 70 75

gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat 288  
 Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn  
 80 85 90 95

tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca 336  
 Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala  
 100 105 110

atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt 384  
 Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val  
 115 120 125

caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa 432  
 Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu  
 130 135 140

gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc ggc ttt aac 480

Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn 145 150 155	
tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr 160 165 170 175	528
agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala 180 185 190	576
aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu 195 200 205	624
gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg 210 215 220	672
aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac Asn Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn 225 230 235	720
gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg 240 245 250 255	768
tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly 260 265 270	816
ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu 275 280 285	864
caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro 290 295 300	912
agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac Asp Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn 305 310 315	960
gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala 320 325 330 335	1008
aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp 340 345 350	1056
gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp 355 360 365	1104
gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser 370 375 380	1152
gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala 385 390 395	1200

tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt	1248
Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly	
400 405 410 415	
atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg	1296
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu	
420 425 430	
gat att aaa gaawact tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa	1344
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys	
435 440 445	
gca aaa tgc aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act	1392
Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr	
450 455 460	
gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat	1440
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn	
465 470 475	
g ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga	1488
Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly	
480 485 490 495	
acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg	1536
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro	
500 505 510	
cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg ccg gaa gga	1584
Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly	
515 520 525	
gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac	1632
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn	
530 535 540	
gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta	1680
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val	
545 550 555	
a ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct	1728
Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala	
560 565 570 575	
act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct	1776
Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala	
580 585 590	
aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac	1824
Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp	
595 600 605	
gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac	1872
Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp	
610 615 620	
gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa	1920
Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys	
625 630 635	
tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc gcg gat atg ccg ctt	1968
Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu	
640 645 650 655	

gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu 660 665 670	2016
ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu 675 680 685	2064
ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile 690 695 700	2112
cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly 705 710 715	2160
cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu 720 725 730 735	2208
cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln 740 745 750	2256
tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met 755 760 765	2304
gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu 770 775 780	2352
ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr 785 790 795	2400
atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser 800 805 810 815	2448
gtt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 820 825 830	2496
tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser 835 840 845	2544
gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile 850 855 860	2592
gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys 865 870 875	2640
ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu 880 885 890 895	2688
acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg 900 905 910 915	2736

900	905	910	
ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt			2784
Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu			
915	920	925	
gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat			2832
Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr			
930	935	940	
ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg			2880
Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr			
945	950	955	
ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt			2928
Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val			
960	965	970	975
cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat			2976
Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp			
980	985	990	
caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct			3024
Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro			
995	1000	1005	
gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg			3072
Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val			
1010	1015	1020	
agt gaa gca gac gct cgc tta tgg cgt cag cag cta gaa gaa aaa ggc			3120
Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly			
1025	1030	1035	
cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa			3150
Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly			
1040	1045		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1048

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus megaterium

&lt;400&gt; 2

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile  
 20 25 30

Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val  
 35 40 45

Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu  
 50 55 60

Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp  
 65 70 75 80

Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp  
 85 90 95



Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met  
100 105 110

Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln  
115 120 125

Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp  
130 135 140

Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr  
145 150 155 160

Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser  
165 170 175

Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn  
180 185 190

Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp  
195 200 205

Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys  
210 215 220

Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly  
225 230 235 240

Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr  
245 250 255

Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu  
260 265 270

Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln  
275 280 285

Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser  
290 295 300

Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu  
305 310 315 320

Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys  
325 330 335

Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu  
340 345 350

~~Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly~~  
~~355 360 365~~

Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala  
370 375 380

Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys  
385 390 395 400

Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met  
405 410 415

Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp  
420 425 430

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala  
435 440 445

Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu  
450 455 460

Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr  
465 470 475 480

Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr  
485 490 495

Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln  
500 505 510

Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala  
515 520 525

Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala  
530 535 540

Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys  
545 550 555 560

Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr  
565 570 575

Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys  
580 585 590

Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp  
595 600 605

Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val  
610 615 620

Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser  
625 630 635 640

Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala  
645 650 655

Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu  
660 665 670

Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu  
675 680 685

~~Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro~~  
690 695 700

Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu  
705 710 715 720

Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu Ala  
725 730 735

His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr  
740 745 750

Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala  
755 760 765

Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu  
770 775 780

Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met  
785 790 795 800

Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu  
805 810 815

Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser  
820 825 830

Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val  
835 840 845

Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala  
850 855 860

Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe  
865 870 875 880

Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr  
885 890 895

Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly  
900 905 910

Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly  
915 920 925

Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu  
930 935 940

Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu  
945 950 955 960

His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln  
965 970 975

His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln  
980 985 990

Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala  
995 1000 1005

Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser  
1010 1015 1020

~~Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg~~  
~~025 1030 1035 1040~~

Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
1045

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 3  
gcaggagacg gggtgnnnac aagctggacg

30

<210> 4  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 4  
cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc

30

<210> 5  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 5  
gaagcaatga acaagnnncg gcgagcaaat ccag

34

<210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 6  
ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg

30

<210> 7  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 7  
gctttgataa aaacttaaag teaannnctt aaatttgtac g

41

<210> 8  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 8  
cgtacaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc

40

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1049

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus megaterium

&lt;400&gt; 9

Met Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys  
 1 5 10 15

Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys  
 20 25 30

Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg  
 35 40 45

Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp  
 50 55 60

Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg  
 70 75 80

Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn  
 85 90 95

Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala  
 100 105 110

Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val  
 115 120 125

Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu  
 130 135 140

Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn  
 145 150 155 160

Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr  
 165 170 175

Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala  
 180 185 190

Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu  
 195 200 205

Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg  
 210 215 220

Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn  
 225 230 235 240

Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg  
 245 250 255

Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly  
 260 265 270

Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu  
 275 280 285

Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro

290	295	300
Ser Tyr Lys Gln Val	Lys Gln Leu Lys Tyr Val	Gly Met Val Leu Asn
305	310	315 320
Glu Ala Leu Arg Leu Trp	Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala	
	325	330 335
Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp		
	340	345 350
Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp		
	355	360 365
Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser		
	370	375 380
Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala		
	385	390 395 400
s Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly		
	405	410 415
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu		
	420	425 430
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys		
	435	440 445
Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr		
	450	455 460
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn		
	465	470 475 480
Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly		
	485	490 495
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro		
	500	505 510
n Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly		
	515	520 525
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn		
	530	535 540
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val		
545	550	555 560
Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala		
	565	570 575
Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala		
	580	585 590
Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp		
	595	600 605
Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp		
	610	615 620
Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys		

625		630		635		640
Ser Thr Leu Ser	Leu Gln Phe Val Asp	Ser Ala Ala Asp Met	Pro Leu			
	645	650	655			
Ala Lys Met His	Gly Ala Phe Ser Thr	Asn Val Val Ala Ser	Lys Glu			
	660	665	670			
Leu Gln Gln Pro	Gly Ser Ala Arg Ser Thr	Arg His Leu Glu Ile	Glu			
	675	680	685			
Leu Pro Lys Glu	Ala Ser Tyr Gln Glu Gly	Asp His Leu Gly Val	Ile			
	690	695	700			
Pro Arg Asn Tyr	Glu Gly Ile Val Asn Arg	Val Thr Ala Arg Phe	Gly			
	705	710	715			720
Leu Asp Ala Ser	Gln Gln Ile Arg Leu Glu	Ala Glu Glu Glu Lys	Leu			
	725	730	735			
a His Leu Pro	Leu Ala Lys Thr Val Ser	Val Glu Glu Leu Leu	Gln			
	740	745	750			
Tyr Val Glu Leu	Gln Asp Pro Val Thr Arg	Thr Gln Leu Arg Ala	Met			
	755	760	765			
Ala Ala Lys Thr	Val Cys Pro Pro His Lys	Val Glu Leu Glu Ala	Leu			
	770	775	780			
Leu Glu Lys Gln	Ala Tyr Lys Glu Gln Val	Leu Ala Lys Arg Leu	Thr			
	785	790	795			800
Met Leu Glu Leu	Leu Glu Lys Tyr Pro Ala	Cys Glu Met Lys Phe	Ser			
	805	810	815			
Glu Phe Ile Ala	Leu Leu Pro Ser Ile Arg	Pro Arg Tyr Tyr Ser	Ile			
	820	825	830			
Ser Ser Ser Pro	Arg Val Asp Glu Lys Gln	Ala Ser Ile Thr Val	Ser			
	835	840	845			
l Val Ser Gly	Glu Ala Trp Ser Gly Tyr	Gly Glu Tyr Lys Gly	Ile			
	850	855	860			
Ala Ser Asn Tyr	Leu Ala Glu Leu Gln Glu	Gly Asp Thr Ile Thr	Cys			
	865	870	875			880
Phe Ile Ser Thr	Pro Gln Ser Glu Phe Thr	Leu Pro Lys Asp Pro	Glu			
	885	890	895			
Thr Pro Leu Ile	Met Val Gly Pro Gly Thr	Gly Val Ala Pro Phe	Arg			
	900	905	910			
Gly Phe Val Gln	Ala Arg Lys Gln Leu Lys	Glu Gln Gly Gln Ser	Leu			
	915	920	925			
Gly Glu Ala His	Leu Tyr Phe Gly Cys Arg	Ser Pro His Glu Asp	Tyr			
	930	935	940			
Leu Tyr Gln Glu	Glu Leu Glu Asn Ala Gln	Ser Glu Gly Ile Ile	Thr			
	945	950	955			960
Leu His Thr Ala	Phe Ser Arg Met Pro Asn	Gln Pro Lys Thr Tyr	Val			

	965		970		975
Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp					
	980		985		990
Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro					
	995		1000		1005
Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val					
	1010		1015		1020
Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly					
	1025		1030		1035
					1040
Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly					
	1045				



Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zu wenigstens einer  
5 der folgenden Reaktionen befähigt ist:
  - a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder  
S-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger  
aromatischer Verbindungen;
  - 10 b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder  
mehrkerniger Aromaten;
  - c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und  
Alkene;
  - 15 d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane  
und Cycloalkene
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, deren Substrat-bindender  
Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen  
Aufnahme des zu oxidierenden Substrats befähigt ist.
- 20 3. Monooxygenase nach Anspruch 1 oder 2, abgeleitet von  
Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, abgeleitet von Cytochrom  
P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer  
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens  
eine funktionelle Mutation in einem der Aminosäurese-  
quenzbereiche 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-  
356, 73-82 und 86-88 aufweist.

---

- 30 5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß  
sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen  
Aminosäuresubstitutionen aufweist:
  - e) Phe87Val;
  - f) Phe87Val, Leu188Gln; oder
  - 35 g) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;  
sowie funktionale Äquivalente davon.
6. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach

einem der vorherigen Ansprüche.

7. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen  
Kontrollenregulativen Nukleinsäuresequenzen eine  
5 kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach  
Anspruch 6 umfasst.

8. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt  
nach Anspruch 7.

9. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit  
wenigstens einem Vektor nach Anspruch 8.

10. Mikroorganismus nach Anspruch 9, ausgewählt unter  
15 Bakterien der Gattung *Escherichia*.

11. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer  
Verbindung gemäß der Definition von Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß man

- 20 a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 9  
oder 10 in einem Kulturmedium, in Gegenwart eines  
exogenen oder intermediär gebildeten Substrats,  
kultiviert; oder  
a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem  
Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 inkubiert;  
und  
b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein  
Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

30 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass  
das exogene oder intermediär gebildete Substrat  
ausgewählt ist unter

- 35 a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-  
heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen  
aromatischen Verbindungen;  
b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen  
Aromaten;  
c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;

d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.

5 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat intermediär gebildetes Indol ist und man aus dem Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildetem Indol erzeugt wurde.

10 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

15 15. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis d), einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

20 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als exogenes Substrat eine Verbindung, ausgewählt unter Indol, n-Hexan, n-Octan, n-Decan, n-Dodecan, Cumol, 1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzothiophen, 30 ~~1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzothiophen,~~  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionon, Acridin, Naphthalin, 6-Methyl- oder 8-Methylchinolin, Chinolin und Chinaldin, einsetzt.

35 17. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in immobilisierter Form.

18. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem

der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach Anspruch 8,  
oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 zur  
mikrobiologischen Oxidation von

- 5 a) ~~gegebenenfalls~~ substituierten N-, O- oder S-  
~~heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen~~  
~~aromatischen Verbindungen;~~
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen  
Aromaten;
- 10 c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;  
und/oder
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und  
Cycloalkenen.

15 19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Herstellung von Indigo  
und/oder Indirubin.

---

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen mit  
verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleotidsequen-  
zen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und  
Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur  
mikrobiologischen Oxidation verschiedener organischer Substra-  
te wie beispielsweise Verfahren zur Herstellung von Indigo und  
Indirubin.

